斜纹夜蛾幼虫诱导的油菜抗虫性及其与茉莉酸信号途径的关系

胡留成，崔 巍，汪 霞，娄永根*
（浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310029）

摘要：植物在受植食性昆虫为害时能产生防御反应，并且植物的茉莉酸信号转导途径在这一过程中发挥着重要作用。然而，迄今为止对于油菜 *Brassica campestris* 的诱导防御反应很少有研究报道。为此，本实验通过测定油菜内茉莉酸和胰蛋白酶抑制剂含量研究了油菜在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫为害后的抗虫性和胰蛋白酶抑制剂含量的变化，并分析这些变化在油菜诱导抗虫性与茉莉酸信号转导途径中的关系。结果表明：斜纹夜蛾幼虫取食能导致油菜体内茉莉酸和胰蛋白酶抑制剂含量系统性上升，外用茉莉酸甲酯处理也能系统性增加油菜的胰蛋白酶抑制剂含量，并且取食茉莉酸甲酯处理或斜纹夜蛾幼虫取食过的叶片能显著降低斜纹夜蛾幼虫的体重，两者的体重分别为对照植株上的 67.5% 和 60.2%。机械损伤加斜纹夜蛾幼虫口腔分泌物处理能引起处理叶中茉莉酸和胰蛋白酶抑制剂含量的增加，但其诱导效果与机械损伤加水没有显著差异，并且两者明显低于虫害的诱导效果，两种处理的茉莉酸和胰蛋白酶抑制剂含量分别为虫害诱导的 68.4% 和 24.4% 及 62.9% 和 36.9%；多次连续机械损伤的诱导效果与一次损伤的没有明显差异。结果说明斜纹夜蛾幼虫诱导的油菜抗虫性与茉莉酸信号转导途径有关，而其激活油菜抗虫反应的机理则可能与其特定的取食行为相关。

关键词：斜纹夜蛾；油菜；植物防御；植物抗虫性；茉莉酸信号转导途径；胰蛋白酶抑制剂
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)09-1001-08

Herbivore resistance induced by *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its relation to the JA signaling pathway in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.)

HU Liu-Cheng, CUI Wei, WANG Xia, LOU Yong-Gen* (Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: When attacked by herbivores, plants produce defense responses, and the jasmonic acid (JA) signaling pathway plays an important role in this process. So far, however, little was known about the herbivore-induced defense responses in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). Therefore, the defense responses of *B. campestris* attacked by *Spodoptera litura* (Fabricius) and their relations to the JA signaling pathway were studied through assaying the contents of JA and trypsin protease inhibitors (TrypPIs) in *B. campestris* plants. The results showed that infestation by *S. litura* resulted in systemic increases in levels of both JA and TrypPIs in *B. campestris* plants, of which the level of TrypPIs could also be systemically induced by exogenous application of methyl jasmonate (MeJA). Moreover, body weights of *S. litura* caterpillars fed on leaves treated by MeJA or infested by the herbivore decreased significantly, only 67.5% and 60.2% of that fed on control leaves, respectively. Treatment with wounding plus the caterpillar oral spit (OS) could cause the increase in JA and TrypPIs level in the treated leaves, but its induction efficacy was similar to that induced by wounding plus water (W) and far lower than that induced by the herbivore infestation. The levels of JA and TrypPIs in OS- or W-treated plants were 68.4% and 62.9%, and 22.4% and 36.9% of those in control plants, respectively. We also found that there was no significant difference in the induction efficacy between the treatments "wounding once" and "wounding multiple times". The results suggest that the defense responses of *B. campestris* plants induced by the herbivore are related to the JA signaling pathway, and elicitation of the responses is probably involved in the specific feeding behavior

基金项目：教育部创新团队资助项目(IRT0535)
作者简介：胡留成，男，1985 年 11 月生，江苏淮安人，硕士研究生，研究方向为分子生态与化学生态，E-mail：hu_l_c123@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yglou@zju.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-01-30；接受日期 Accepted: 2010-07-08

of the herbivore.

Key words: *Spodoptera litura*; Chinese cabbage (*Brassica campestris*); plant defense; plant resistance to insects; JA signaling pathway; trypsin protease inhibitors

植物在受植食性昆虫攻击时，会在物理、化学等方面作出特异性的诱导防御反应，从而影响植食性昆虫的生长、发育、繁殖与存活(Arimura *et al.*, 2005; Mewis *et al.*, 2005; Lou and Baldwin, 2006)。植物的诱导防御反应起始于植物对植食性昆虫口腔分泌物或产卵器分泌物中激发子(elicitor)的识别，然后通过激活体内茉莉酸、水杨酸和乙烯等多种信号转导途径，最终产生防御反应(防御基因表达水平上升、防御化合物积累、抗虫性上升)(Howe and Jander, 2008)。至今，植食性昆虫的激发子已鉴定了多种，如FACs (fatty acid-amino acid conjugates)、β-葡萄糖苷酶、inceptin 和 Bruchins 等(Howe and Jander, 2008)。在植物的多种信号转导途径中，茉莉酸信号转导途径在诱导防御反应中发挥着中心作用(Paschold *et al.*, 2007; Howe and Jander, 2008; Zhou *et al.*, 2009)。

植物的诱导防御化合物主要包括次生化合物和防御蛋白质。次生化合物主要是萜类化合物、酚类化合物以及含氮和含硫化合物；防御蛋白质则主要包括蛋白酶抑制剂、多酚氧化酶、亮氨酸氨基肽酶、凝集素和几丁质酶等(Chen, 2008)。蛋白酶抑制剂是植物防御化合物中研究得最多的。已有结果表明，蛋白酶抑制剂能通过抑制昆虫幼虫中肠的蛋白酶活性而影响一些鳞翅目或鞘翅目幼虫的生长发育与存活(Tamhane *et al.*, 2005; Bhattacharyya *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007)；蛋白酶抑制剂受植食性昆虫取食、病原菌浸染、机械损伤以及信号分子如茉莉酸、水杨酸、乙烯或脱落酸处理等的诱导表达(van Dam *et al.*, 2001; Casaretto *et al.*, 2004)。由于蛋白酶抑制剂的重要抗虫作用，很多植物研究系统，如蕃茄 *Solanum lycopersicum*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、烟草 *Nicotiana tabacum* 等已将蛋白酶抑制剂活性的变化作为考察植物诱导防御反应的一个重要指标(Ryan, 1990; Qu *et al.*, 2003)。

油菜 *Brassica campestris* L. 是中国最重要的油料作物，受到斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius)和甘蓝蚜 *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus)等多种害虫危害，对油菜产量造成严重威胁。尽管目前已在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、烟草 *Nicotiana tabacum* 和蕃茄 *Solanum lycopersicum* 等植物中开展了大量植物诱导防御反应的研究工作(Kessler and Baldwin, 2001; Park *et al.*, 2001; Botelho-Júnior *et al.*, 2008)，但在油菜上尚未进行相关研究。为此我们以油菜-斜纹夜蛾为研究对象，以胰蛋白酶抑制剂(trypsin protease inhibitors, TrypPIs)作为考察油菜诱导抗虫性的化学指标，测定了斜纹夜蛾为害后油菜抗虫性和胰蛋白酶抑制剂含量的变化，并剖析了这些变化与斜纹夜蛾口腔分泌物以及油菜茉莉酸信号转导途径的关系。这些研究对于揭示植物诱导防御反应机理、深入认识昆虫与植物的互作关系以及开发油菜害虫治理的新途径，如研发油菜的诱导抗虫剂等具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 供试油菜

供试油菜 *Brassica campestris* L. 品种为浙双738，种子播在塑料盆中(高 3.8 cm，长 27.2 cm，宽 20.6 cm)，置于光照培养箱(温度 28 ± 2℃，RH 80%，光周期 12L∶12D)中催苗，待 2 片子叶完全展开后移载至温室(温度 28 ± 2℃，RH 80%，光周期 12L∶12D)种植。移栽时使用阳光一号泥炭混合珍珠岩(2∶1)按比例混合放置于塑料盆(直径 24 cm，高 20 cm)中，单盆单株种植，定期浇水施肥，待油菜植株长至 7 叶时供试验用。

1.2 供试昆虫

供试昆虫为斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 2 龄幼虫。田间采集的斜纹夜蛾卵块，置于预先垫好湿润医用纱布的密封玻璃瓶中，置于光照培养箱(温度 28 ± 2℃，RH 80%，光周期 12L∶12D)中至幼虫孵化。将孵化的幼虫转至密封塑料饲养箱中，用人工饲料喂养，2 龄幼虫用于实验。部分幼虫用于继代饲养，幼虫化蛹前，放置废弃泥炭及蜂蜜浸湿的医用棉球，用于提高化蛹率，并同时保证成虫羽化后能够及时补充营养。羽化后在饲养箱中放入干燥的医用纱布便于成虫产卵。

1.3 油菜处理

1.3.1 斜纹夜蛾幼虫处理：在油菜第 2、3 叶(以完全展开的第 1 张叶片为第 1 叶，老的叶片分别依次命名为第 2，3，4 叶等)上接 5 头斜纹夜蛾初孵幼虫，

定时观察，以防止幼虫逃逸。茉莉酸含量测定实验中，以 0 h 不处理株作为对照；胰蛋白酶抑制剂含量测定实验中，以各时间点不处理株作为对照。

1.3.2　机械损伤处理：主要包括一次性机械损伤和连续机械损伤。一次性机械损伤，即在同一时间内，在油菜第 2、3 叶上，利用自制滑轮进行与叶脉垂直方向的每叶 8 条或 16 条机械损伤(前者为 4 h 一次性机械损伤，后者为 8 h 一次性机械损伤)；连续机械损伤，即分别在油菜第 2、3 叶片上利用自制滑轮进行与叶脉垂直方向的 2 条机械损伤，其后每间隔 0.5 h，再对叶片进行相同量的机械损伤，直至 4 h 或 8 h 后，累积达 8 条或 16 条机械损伤(前者为 4 h 连续机械损伤，后者为 8 h 连续机械损伤)。以不做任何处理的植株作为对照。

1.3.3　斜纹夜蛾幼虫口腔分泌物处理：利用毛细管收集斜纹夜蛾 4 龄幼虫口腔分泌物。口腔分泌物置于 -20℃ 冰箱保存。在油菜第 2、3 叶片上利用滑轮对每片叶片进行 6 条与叶脉平行方向的机械损伤，然后在每叶片的损伤部位分别涂抹稀释 5 倍的唾液 10 μL。以相同机械损伤后涂抹 10 μL 双蒸水为对照。

1.3.4　茉莉酸甲酯处理：在油菜的第 2、3 叶上涂抹含茉莉酸甲酯(MeJA)的羊毛脂(lanolin) 10 μL，茉莉酸甲酯设 3 个处理浓度：150 μg/20 μL，75 μg/20 μL 和 37.5 μg/20 μL。以涂抹不含茉莉酸甲酯的羊毛脂的油菜植株作为对照。

1.4　油菜胰蛋白酶抑制剂含量的测定

对虫害处理株、口腔分泌物处理株、茉莉酸甲酯处理株及其相应的对照株，在处理后 1，3，5 d 分别取第 1，3，4 叶；不同方式机械损伤处理株及其对照株于处理后 5 d 取第 3 叶。各处理各时间点重复 5 次。取样时去除叶脉，约取 0.2 g 叶片。样品取下后立即包于标明信息的锡箔纸中，并在液氮中速冻后，-80℃ 冰箱保存待测。

油菜胰蛋白酶抑制剂含量的测定利用径向扩散法(radial diffusion assay)，具体方法参照 Lou 和 Baldwin (2006)的方法进行。胰蛋白酶抑制剂的浓度用 nmol/mg protein 表示。

1.5　油菜体内茉莉酸含量的测定

虫害处理株在处理后 1，2，4，8，24 h 分别取第 1，3，4 叶，以 0 h 不接虫作为对照；口腔分泌物处理株及水处理株在处理后的 0.5，1，2，4，8 h 取第 3 叶，以 0 h 不处理作为对照；不同方式机械损伤处理株于处理后 4、8 h 取第 3 叶，以 0 h 不处理作为对照。各处理各时间点重复 5 次。取样时去除叶脉，约取 0.2 g 叶片。样品取下后立即包于标明信息的锡箔纸中，并在液氮中速冻后，-80℃ 冰箱保存待测。

油菜体内茉莉酸提取时，在每个样品(1 mL)中加入 328 ng $^2H_2$-JA(德国马谱化学生态学研究所 Ian T. Baldwin 教授馈赠)作为内标，提取方法参照 Park 等(2001)的方法。茉莉酸含量的测定利用气谱-质谱联用仪，直接在 280℃ 的 GC 中进样，进样量为 1 μL，色谱柱利用 HP5-MS 毛细管柱(30 m × 0.25 mm ID，膜厚 0.25 μm)。柱温采用程序升温，60℃ (4 min) 至 300℃，升温速度 20℃/min，至 300℃，保持 10 min。气谱/质谱接口温度 280℃；EI 离子源，电离能 70 eV。以 99.999% 高纯氦气作为载气，柱流量 1 mL/min。

1.6　斜纹夜蛾取食处理对油菜抗虫性的影响

在油菜第 2、3 叶片上接 3 头斜纹夜蛾 2 龄幼虫，取食 3 d 后去掉为害的幼虫，并在第 1、4 叶上各接 2 头初孵的斜纹夜蛾幼虫。定时观察，以防止幼虫逃逸。于接虫后 3，6 和 9 d 对虫体称重，以健康油菜植株饲养的幼虫为对照。各处理重复 15 次。

1.7　茉莉酸甲酯处理对油菜抗虫性的影响

取 150 μg/20 μL 茉莉酸处理株处理 3 d 的叶片，用于饲养斜纹夜蛾初孵幼虫，每个培养皿中放入 3 头初孵幼虫，培养皿底铺一层湿润的医用纱布以保湿。定期更换叶片，以保证幼虫的食料新鲜充足。饲养9 d后将饲养的幼虫进行称重。对照幼虫以羊毛脂处理植株或健康植株叶片饲养。各处理重复 30 次。

1.8　数据统计与分析

利用 Statistic 软件进行统计分析(Statistica，SAS，Institute Inc.，Cary，NC，USA)。幼虫为害诱导的茉莉酸含量，相同叶位不同时间点含量与 0 h 进行 *t* 检验；机械损伤诱导的茉莉酸含量，分别对 2 种处理相同时间点进行 *t* 检验，相同处理不同时间点与 0 h 进行 *t* 检验。蛋白酶抑制剂含量，相同时间点不同处理进行方差分析，方差分析显著的，进行 Duncan 氏多重比较。利用 *t* 检验检测 MeJA 处理或幼虫取食对斜纹夜蛾幼虫生长的影响。

2　结果与分析

2.1　不同处理对油菜不同叶位叶片内 JA 含量的影响

斜纹夜蛾幼虫取食为害能导致油菜受害叶片及

其上、下叶位叶片内 JA 含量的迅速升高(图 1：A)。总体来看，与没有受害虫为害的叶片(0 h)相比，3 个叶片中的 JA 含量均在幼虫为害后 1 h 开始上升，2 - 4 h 达到最高值，之后逐渐下降。

机械损伤后的水处理和口腔分泌物处理，均能导致处理油菜植株体内 JA 含量的升高，并在处理后的 1 - 8 h 显著高于健康植株体内的 JA 含量(0 h)。但两者所诱导的 JA 含量没有显著差异(图 1：B)，并且从诱导的 JA 含量来看，两者的诱导效果要弱于虫害诱导的(图 1：A)。

我们也测定了不同机械损伤方式对油菜体内 JA 含量的影响。结果表明，多次连续机械损伤并不比一次性机械损伤能诱导更高的 JA 含量，相反，还有一定程度的下降，尽管两者间差异并不显著(图 1：C)。

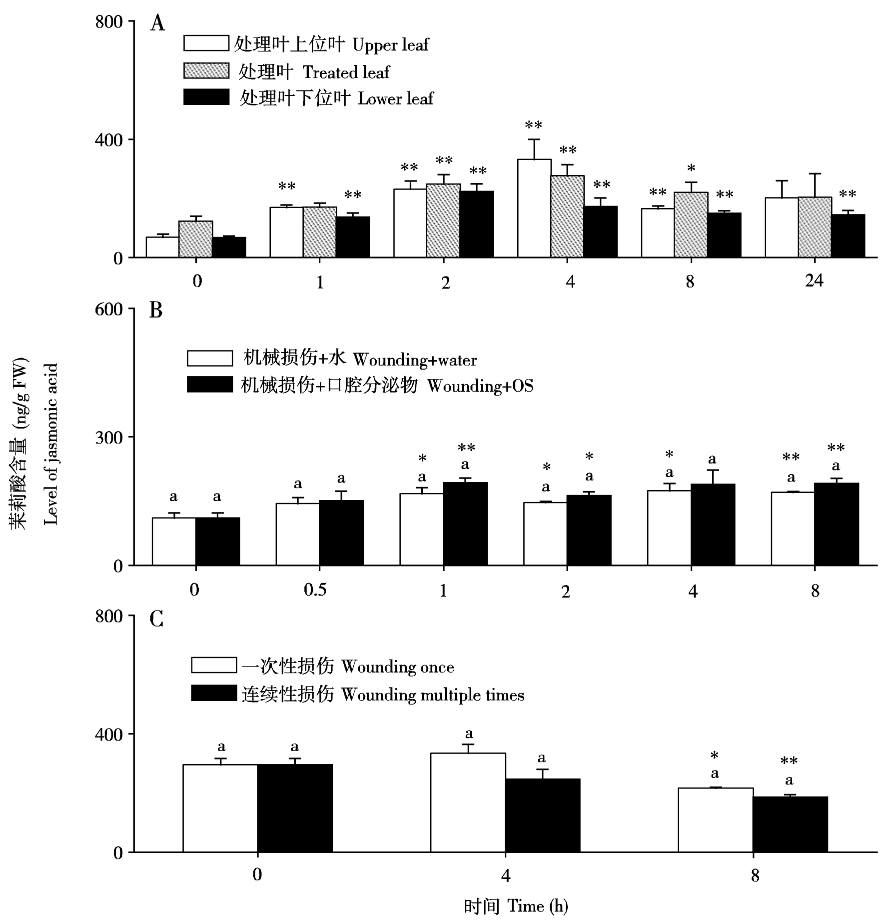


图 1 不同处理后油菜叶片茉莉酸含量(平均数 ± 标准误)的变化

Fig. 1 Changes in JA levels (mean ± *SE*) in *Brassica campestris* leaves with different treatments

A：斜纹夜蛾幼虫危害 Herbivore infestation；B：机械损伤加口腔分泌物处理 Wounding plus oral secretions (OS) of *Spodoptera litura*；C：机械损伤 Wounding. OS：斜纹夜蛾幼虫的口腔分泌物 Oral secretions collected from *S. litura* larva. 同一时间点不同字母表示差异显著(t 检验，$P<0.05$)；“*”，“**”表示不同时间点相同处理与 0 h 进行 t 检验差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。Different letters at the same time indicated significant differences between treatments (t-test, $P<0.05$). Asterisks indicates significant differences between members of a pair (each treatment time *vs* 0 h; t-test, *, $P<0.05$; **, $P<0.01$).

2.2 虫害及机械损伤处理对油菜 TrypPIs 含量的影响

与不处理的对照相比，害虫为害 3 d 和 5 d 可显著提高为害叶及其下位叶中 TrypPIs 的含量，但在为害叶的上位叶中，TrypPIs 含量在第 1，3 天与对照没有显著差异，在第 5 天时极显著低于对照(图 2)。

与作为对照的机械损伤加水处理相比，机械损伤加口腔分泌物处理不能诱导油菜体内 TrypPIs 含量的上升；相反，在处理叶处理后 1 d 和处理叶下位叶处理后 5 d，口腔分泌物处理的要比水处理的 TrypPIs 含量明显下降(图 2：B，C)。与不处理的对

照相比，机械损伤加水处理和加口腔分泌物处理都能在一定程度上诱导 TrypPIs 含量的上升，并且对不同叶位的诱导效果与害虫为害的类似，但总体上这 2 种处理的诱导效果都要弱于害虫为害的诱导效果，尤其以机械损伤加口腔分泌物处理诱导效果最弱(图 2)。

与不处理对照相比，8 h 一次性机械损伤和连续机械损伤都可以诱导处理叶，处理叶上位叶和下位叶中 TrypPIs 含量的显著上升，但两者间却没有显著差异(图 2：D)。

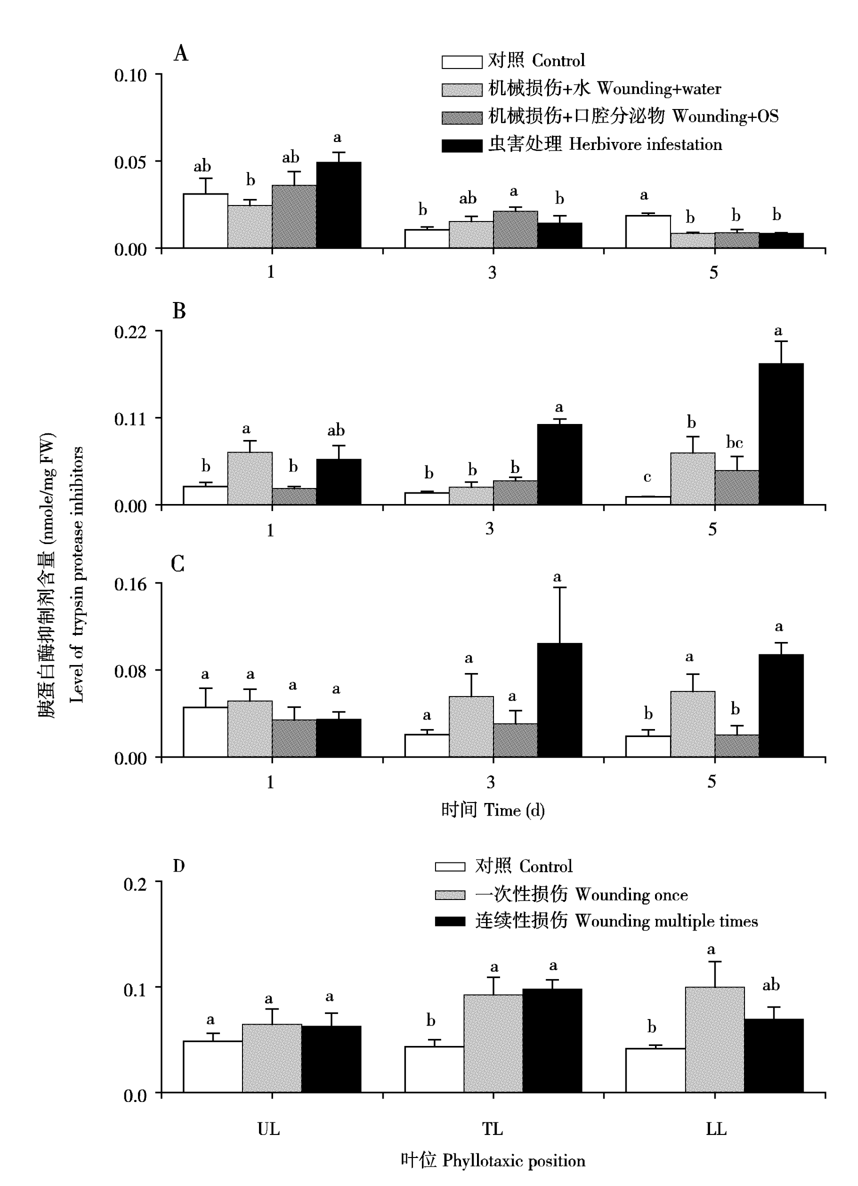


图 2　不同处理不同叶位叶片内胰蛋白酶抑制剂含量(平均数 ± 标准误)的变化

Fig. 2　Changes in levels of TrypPIs (mean ± *SE*) in *Brassica campestris* leaves at different phyllotaxic positions with different treatments

A：处理叶上位叶 Upper leaf，UL；B：处理叶 Treated leaf，TL；C：处理叶下位叶 Lower leaf，LL；D：不同形式的机械损伤 Different wounding (8 h). OS：Oral secretions. 同一时间点或同一叶位不同字母表示差异显著(Duncan 氏多重比较，$P < 0.05$)。Different letters above bars at the same time or leaf position indicated significant differences between treatments (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

2.3　茉酸甲酯处理对油菜 TrypPIs 含量的影响

3 种浓度的茉莉酸甲酯处理都可诱导油菜植株体内 TrypPIs 含量的显著增加(图 3)。与处理叶的上、下叶片相比，3 种浓度的茉莉酸甲酯在处理叶中对 TrypPIs 的诱导效果最明显，均在处理后 1，3 和 5 d 显著提高 TrypPIs 的含量。在 3 种茉莉酸甲酯浓度中，则以 75 μg/20 μL 对 TrypPIs 的诱导作用最显著(图 3)。

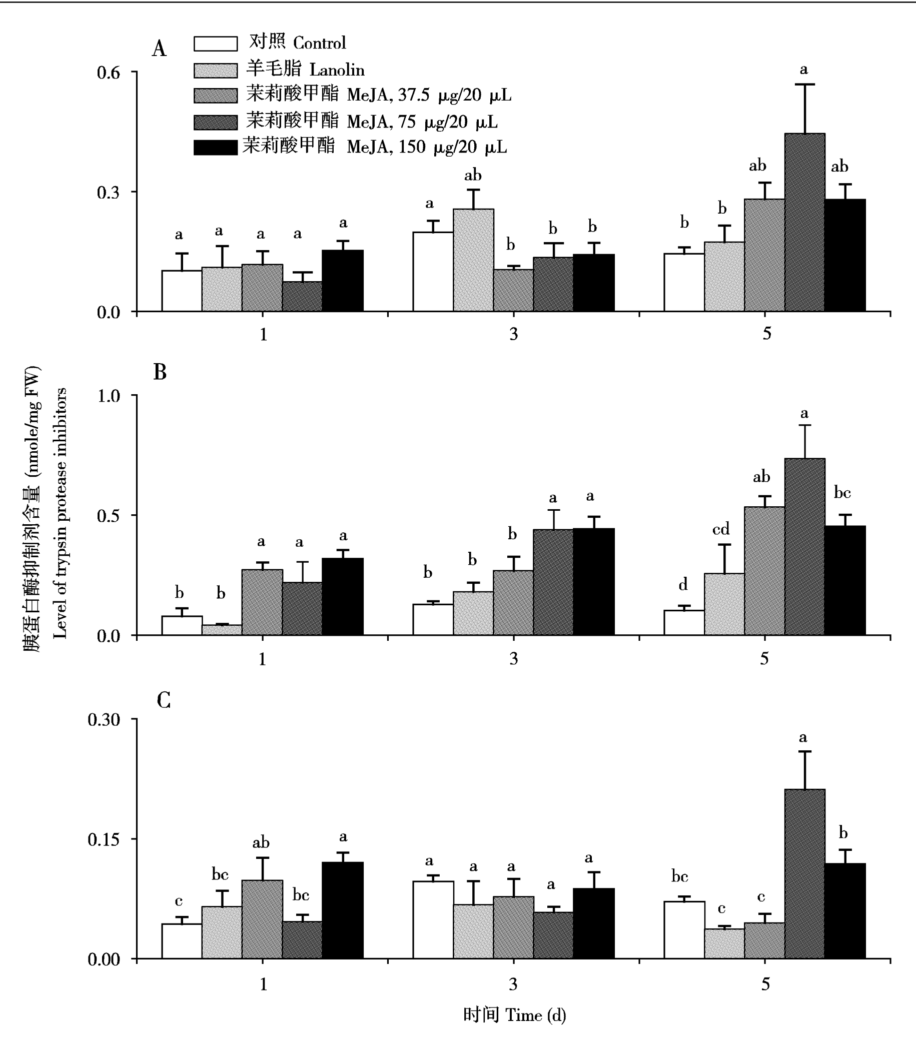


图 3 MeJA 处理不同叶位叶片内胰蛋白酶抑制剂含量(平均数 ± 标准误)变化

Fig. 3 Changes in levels of TrypPIs (mean ± *SE*) in *Brassica campestris* leaves at different phyllotaxic positions with MeJA treatment

A：上位叶 Upper leaf；B：处理叶 Treated leaf；C：下位叶 Lower leaf. 同一时间点不同字母表示差异显著(Duncan 氏多重比较，$P<0.05$)。Different letters at the same time indicated significant differences between treatments (Duncan's multiple range test, $P<0.05$).

2.4 茉莉酸甲酯处理对油菜抗虫性的影响

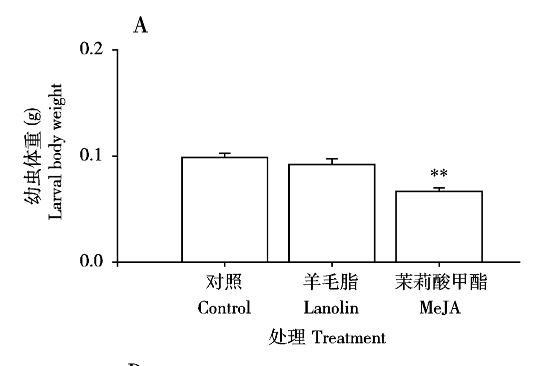
结果(图 4：A)表明，取食茉莉酸甲酯处理叶片的斜纹夜蛾幼虫，9 d 后的体重比取食未处理或羊毛脂处理叶片的幼虫体重显著降低，而后两者在体重上无明显差异。

2.5 幼虫取食对油菜抗虫性的影响

结果表明，取食斜纹夜蛾幼虫为害后叶片的幼虫，在第 3 天和 6 天的体重，与取食未处理叶片的幼虫无显著差异，但在第 9 天时，前者的重量极显著地低于后者(图 4：B)。

3 讨 论

油菜在受到斜纹夜蛾幼虫为害后，其受害叶及其上、下叶中茉莉酸含量显著上升(图 1：A)，并且作为重要防御化合物的胰蛋白酶抑制剂含量也在受害叶及其下叶中明显增加(图 2：A，B，C)。此外，外用 3 种浓度的茉莉酸甲酯处理油菜植株，可以明显诱导处理叶及其上下叶中胰蛋白酶抑制剂含量的上升(图 3)。这些结果说明，斜纹夜蛾幼虫的取食为害，能系统性激活油菜体内的茉莉酸信号转导途径，并由此而引起油菜胰蛋白酶抑制剂含量部分系统性增加(在受害叶上位叶中不增加，图 2：A)。作为植物体内与防御相关的重要信号转导途径，茉莉酸信号转导途径在植食性昆虫诱导的植物防御反应中发挥着重要作用(Walling, 2000)，并且在很多种植物中发现茉莉酸能诱导植物蛋白酶抑制剂含量上升(Rakwal *et al.*, 2001；Casaretto *et al.*, 2004；Botelho-Júnior *et al.*, 2008)。如在烟草中，烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫为害及其唾液处理能诱导烟草



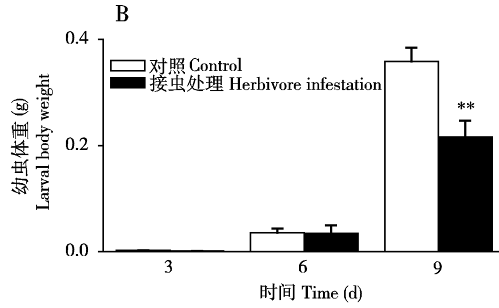


图 4　不同处理对斜纹夜蛾幼虫体重(平均数 ± 标准误)的影响

Fig. 4　Mean body weight (mean ± *SE*) of *Spodoptera litura* larvae fed on plants with different treatments

A：MeJA 处理 Plants were previously treated with MeJA；B：斜纹夜蛾幼虫取食处理 Plants were previously infested by *S. litura* larvae. “ ** ”表示同一时间点处理与对照差异极显著(t 检验，$P < 0.01$)。Asterisks at the same time indicate significant differences between treatments and control (** , t-test, $P < 0.01$).

植株中茉莉酸含量上升，并导致多种蛋白酶抑制剂含量增加(van Dam *et al.*, 2001)。二化螟 *Chilo suppressalis* 危害反义抑制 *LOX* 转基因水稻后，茉莉酸和胰蛋白酶抑制剂的含量降低(Zhou *et al.*, 2009)。因此，与其他研究报道的结果类似，在斜纹夜蛾幼虫取食诱导的油菜胰蛋白酶抑制剂合成中，茉莉酸信号转导途径起着重要作用。

本文中一个非常有意思的结果是，斜纹夜蛾幼虫为害能导致受害叶上位叶中茉莉酸含量上升(图 1)，但胰蛋白酶抑制剂含量却不上升，甚至下降(图 2)；而外用茉莉酸甲酯处理又能导致上位叶中胰蛋白酶抑制剂含量的上升(图 3)。由于本文中的处理叶上位叶是完全展开的第一张叶片，需要更多的能量用于生长，因此一个可能的原因是，与处理叶及其下位叶相比，上位叶需要更高的茉莉酸浓度才能激活其防御反应。本文中，受害叶上位叶中测得的最高茉莉酸浓度不足 400 ng/g FM，远低于茉莉酸甲酯处理中茉莉酸甲酯的浓度(最低浓度为 37.5 μg/20 μL)。也许真是这种浓度上的差异，导致了两种不同的结果。当然，受害叶上位叶中胰蛋白酶抑制剂含量不上升的真正原因尚有待进一步深入研究。

蛋白酶抑制剂的抗虫作用已被很多的研究所证实(Ryan, 1973；Macedo *et al.*, 2002；Sagili *et al.*, 2005；Tamhane *et al.*, 2007；Oliveria *et al.*, 2007；Wang *et al.*, 2007)。本文的研究结果也表明，茉莉酸甲酯处理或斜纹夜蛾幼虫取食能导致处理植株胰蛋白酶抑制剂含量的系统性增加(图 2, 3)；而取食上述任何一种处理后的油菜叶片，则引起斜纹夜蛾幼虫体重的显著降低(图 4)。说明胰蛋白酶抑制剂也可能是油菜中抗斜纹夜蛾幼虫的重要防御化学物质之一。

已有很多研究表明，植食性昆虫口腔分泌物中的某些成分，或称激发子(elicitors)能诱导植物表现出不同于机械损伤的特异性防御反应(Arimura *et al.*, 2005)。然而，本文的研究结果却表明，机械损伤加水或口腔分泌物处理对油菜茉莉酸或胰蛋白酶抑制剂含量的影响没有显著差异，并且相比于虫害取食，诱导效果明显降低(图 1, 2)。这一结果说明斜纹夜蛾幼虫的口腔分泌物在诱导油菜的防御反应中可能并不重要。类似的研究结果在其他一些植物-植食性昆虫研究系统中也有发现。如烟草在受机械损伤加水或棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 口腔分泌物处理后，所释放的挥发物没有明显差异(Yan *et al.*, 2005)。昆虫的一些激发子，如 FACs 对利马豆 *Phasrolus lunatus* L. 和棉花 *Gossypium* spp. 的挥发物没有诱导作用(Mithöfer *et al.*, 2005)。因此，昆虫的口腔分泌物是否在植物诱导防御反应中起到激发子的作用，可能取决于昆虫与植物之间的相互作用。

为了探明连续机械损伤在诱导反应中的可能作用，我们比较了一次机械损伤与多次机械损伤之间的差异。结果表明，多次机械损伤并不比一次机械损伤所诱导的反应明显，相反却有降低的趋势(图 1, 2)。是人工机械损伤与斜纹夜蛾幼虫实际取食所造成的机械损伤不同而导致了不同的结果，还是这种诱导反应需要一边机械损伤一边加昆虫的唾液成分所能诱导，这需要进一步地深入阐明。

参 考 文 献 (References)

Arimura G, Kost C, Boland W, 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734: 91 – 111.

Bhattacharyya A, Leighton SM, Babu CR, 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145: 669 – 677.

Botelho-Júnior S, Siqueira-Júnior CL, Jardim BC, Machado OLT, Neves-Ferreira AGC, Perales J, Jacinto T, 2008. Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora* f. *edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding and herbivory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9404 – 9409.

Casaretto JA, Zúñiga GE, Corcuera L, 2004. Abscisic acid and jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 161: 389 – 396.

Chen MS, 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 15: 101 – 114.

Howe GA, Jander G, 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41 – 66.

Kessler A, Baldwin IT, 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2141 – 2144.

Lou YG, Baldwin IT, 2006. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuate* improves performance of native herbivores. *Plant Physiology*, 140: 1126 – 1136.

Macedo MLR, Mello GC, Freire MGM, Novello JC, Marangoni S, Matos DGG, 2002. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 891 – 898.

Mewis I, Appel HM, Hom A, Raina R, Schultz JC, 2005. Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology*, 138: 1149 – 1162.

Mithöfer A, Wanner G, Boland W, 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology*, 137: 1160 – 1168.

Oliveria AS, Migliolo L, Aquino RO, Ribeiro JKC, Macedo LLP, Andrade LBS, Bemquerer MP, Santos EA, Kiyota S, Sales MP, 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its vitro effects towards digestive enzymes from insect pest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 858 – 865.

Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH, 2001. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-Type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*, 13: 1035 – 1046.

Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT, 2007. Co(i)-ordinating defenses *NaCOI1* mediates herbivore induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *The Plant Journal*, 51: 79 – 91.

Qu LJ, Chen J, Liu MH, 2003. Molecular cloning and functional analysis of a novel type of Bowman-Birk inhibitor gene family in rice. *Plant Physiology*, 133: 560 – 570.

Rakwal R, Agrawal GK, Jwa NS, 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene*, 263: 189 – 198.

Ryan CA, 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24: 173 – 196.

Ryan CA, 1990. Protease inhibitor in plants-genes for improving defenses against pest and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 425 – 449.

Sagili RR, Pankiw T, Salzman KZ, 2005. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 51: 953 – 957.

Tamhane VA, Chougule NP, Giri AP, 2005. *In vivo* and *in vitro* effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1722: 156 – 167.

Tamhane VA, Giri AP, Sainani MN, 2007. Diverse forms of Pin-Ⅱ family proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Gene*, 403: 29 – 38.

van Dam NM, Horn M, Mareš M, Baldwin IT, 2001. Ontogeny constrains systemic proteinase inhibitor response in *Nicotiana attenuate*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(3): 547 – 568.

Walling LL, 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19: 195 – 216.

Wang ZY, Ding LW, Ge ZJ, Wang ZY, Wang FH, Li N, Xu ZF, 2007. Purification and characterization of native and recombinant SaPIN2a, a plant sieve element-localized proteinase inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 757 – 766.

Yan ZG, Yan YH, Wang CZ, 2005. Attractiveness of tobacco volatiles induced by *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa assulta* to *Campoletis chlorideae*. *Chinese Science Bulletin*, 50(13): 1334 – 1341.

Zhou GX, Qi JF, Ren L, Lou YG, 2009. Silencing *OsHI-LOX* makes rice more susceptible to chewing herbivores, but enhances resistance to a phloem feeder. *The Plant Journal*, 60: 638 – 648.

Zhu YC, Abel CA, Chen MS, 2007. Interaction of Cry1Ac toxin (*Bacillus thuringiensis*) and proteinase inhibitors on the growth, development, and midgut proteinase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 39 – 46.

（责任编辑：袁德成）